

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 9 月 30 日 (30.09.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/083856 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 33/50, 33/48 (74) 代理人: 津国 肇 (TSUKUNI, Hajime); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門1丁目2番12号 SVAXTSビル Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/011972
- (22) 国際出願日: 2003 年 9 月 19 日 (19.09.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2003-75552 2003 年 3 月 19 日 (19.03.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人浜松科学技術研究振興会 (HAMAMATSU FOUNDATION FOR SCIENCE AND TECHNOLOGY PROMOTION) [JP/JP]; 〒432-8561 静岡県浜松市城北3-5-1 静岡大学浜松キャンパス内 Shizuoka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 金岡 繁 (KANAOKA, Shigeru) [JP/JP]; 〒431-3192 静岡県浜松市半田山1丁目20-1 浜松医科大学内 Shizuoka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF DETECTING COLON CANCER MARKER

(54) 発明の名称: 大腸癌マーカー検出方法

(57) Abstract: It is intended to provide a non-invasive and convenient method of detecting a tumor marker for diagnosing colon cancer which is superior in sensitivity and specificity to the existing fecal occult blood test. More specifically speaking, a method of detecting a tumor marker of colon cancer which comprises collecting biological sample which is immediately frozen using liquid nitrogen in some cases, homogenizing the sample in the presence of an RNA digesting enzyme to give a suspension, extracting RNA from the obtained suspension, subjecting the extracted RNA to reverse transcription to give cDNA, amplifying the obtained cDNA and then detecting the thus amplified cDNA. This method is characterized by involving no procedure of separating cell components from the biological sample.

(57) 要約: 本発明は、従来の便潜血検査を超える感度及び特異度を有する非侵襲的かつ簡便な大腸癌診断のための腫瘍マーカーの検出方法を提供する。具体的には、採取された、場合により液体窒素を用いて直ちに凍結された生物学的サンプルを、RNA分解酵素阻害剤の存在下で均質化し、懸濁物を調製し、得られた懸濁物からRNAを抽出し、抽出されたRNAを逆転写しcDNAを得、得られたcDNAを増幅し、増幅されたcDNAを検出する、大腸癌診断のための腫瘍マーカーの検出方法であって、生物学的サンプルから細胞成分を分離する手段を含まないことを特徴とする方法。

明 細 書

大腸癌マーカー検出方法

技術分野

- 5 本発明は、生物学的サンプルから細胞成分を分離する手段を含まないことを特徴とする、生物学的サンプルからRNAを抽出する工程を含む大腸癌診断のための腫瘍マーカーの検出方法に関する。

背景技術

- 10 大腸癌による死亡者が、増加している。大腸癌による死亡者は、全ての癌による死亡者のうち男性においては第4番目、女性においては第2番目に多い癌である（1999年度癌死統計）。また、2015年の癌患者推計では、男女とも似に第一位になると推計されており、二次的な予防を含めた総合的な大腸癌対策が求められており、癌の集団検診は、最も効果的な方法の一つである。

- 15 癌の集団検診（mass screening）のためには、簡便かつ非侵襲性の検出方法であることが重要である。現在利用することができる唯一の非侵襲性の方法は、潜血の有無を調べる糞便検査、すなわち便潜血検査であり、大腸癌の集団検診の標準方法として広く用いられている。

- 20 しかし、便潜血検査は、糞便中にヘモグロビンが現れることが腫瘍に特異的なものではないことから、感度及び特異度が低く（感度30～90%、特異度70～98%）、そのため偽陰性や偽陽性が少なからず存在するという欠点がある。

- 25 また、大腸癌の診断には、免疫学的便潜血法によるスクリーニングの後か、又は同時に、全大腸内視鏡検査又は注腸検査とS状結腸内視鏡検査とが組み合わせて用いられており、多大な時間と労力がかかるという欠点がある。

 便潜血検査の代替法としては、糞便中のK-ras、p-53、APC遺伝子変異やマイクロサテライト不安定性を検出する等のDNAを用いた方法が報告されている（シドランスキー等著（D. Sidransky, et al.）、サイエンス（Science）、第256巻、1992年4月3日、第102頁～第105頁；ドン

等著 (S.M.Dong, et al.)、ジャーナル・オブ・ザ・ナショナル・キャンサー・
インスティテュート (Journal of the National Cancer Institute)、第 93 巻、
第 11 号、2001 年 6 月 11 日、第 858 頁～第 865 頁；トラベルソ等著
(G.Traverso, et al.)、ザ・ニューイングランド・ジャーナル・オブ・メディ
5 シン (The New England Journal of Medicine)、第 346 巻、第 5 号、
2002 年 1 月 31 日、第 311 頁～第 320 頁；トラベルソ等著 (G.Traverso,
et al.)、ザ・ランセット (The Lancet)、第 359 巻、2002 年 2 月 2 日、第
403 頁～第 404 頁)。

これらの DNA を用いる方法は、非侵襲的で癌細胞の直接的変化を捉えること
10 ができる方法であり、特異度が高いという特徴を有し、将来性豊かな方法と考え
られるが、従来技術である便潜血検査と比べると感度が低く、また、時間と労力
もかなりかかるという欠点がある。

また、さらなる便潜血検査の代替法として、遺伝子発現をより直接的に検出す
るために、糞便中のタンパク質キナーゼ C (PKC) 等の mRNA を検出する方
15 法も開発されている (デビッドソン等著 (L.A.Davidson, et al.)、カーシノ
ジェネシス (Carcinogenesis)、第 19 巻、第 2 号、1998 年、第 253 頁～
第 257 頁；アレキサンダー及びライハット等著 (R.J.Alexander and
R.F.Raicht)、ダイジェスティブ・デジージス・アンド・サイエンス (Digestive
Diseases and Sciences)、第 43 巻、第 12 号、1998 年、第 2652 頁～第
20 2658 頁；ヤマオ等著 (T.Yamao et al.)、ガストロエンテロロジー
(Gastroenterology)、第 114 巻、第 6 号、1998 年、第 1198 頁～第
1205 頁)。

しかし、上記の RNA を用いる方法によっても、少量の糞便から簡便かつ効率
的に RNA を抽出することができず、便潜血法を超える感度を得ることができな
25 かった。

PCR 法を逆転写酵素反応 (RT) と組み合わせることによって、RNA を定
性的に、また定量的に検出する方法が知られている。この RT-PCR 法は、微
量分子を検出することができる感度の高さと、ノーザンブロット法に優り、また、
手技の速さや容易さで in situ ハイブリダイゼーション法に優るものである。

しかし、RNAは、DNAに比べて不安定であり、かつ、全ての生物学的試料中に普遍的に存在し、極めて安定であるRNA分解酵素（RNase）による分解の危険性に常にさらされていることから、RT-PCR法においても、RNAの精製過程及び精製後においても、RNaseが混入しないように厳密な管理が要求される。

したがって、糞便という生物学的に極めて粗製の試料からRNAを抽出する際には、RNaseの影響を排除するために、予め細胞画分を分離する工程が必要とされていた。

したがって、極めて多量の微生物に由来する膨大な量のRNaseが存在する糞便中から直接RNAを検出することは、不可能であり、少なくとも微生物等に由来する外因性RNase除去のために細胞画分の分離は、必須であると考えられていた。

しかし、本発明者は、驚くべきことに、場合により凍結した生物学的試料をRNA分解酵素阻害剤の存在下に均質化することによって、上記課題を解決することができることを発見し、本発明を完成させた。

発明の開示

したがって、本発明の目的は、従来の便潜血検査を超える感度及び特異度を有する非侵襲的かつ簡便な大腸癌診断のための腫瘍マーカーの検出方法を提供することにある。

本発明は、下記工程：

a) 採取された生物学的サンプルをRNA分解酵素阻害剤の存在下で均質化し、懸濁物を調製する工程、

を含む大腸癌診断のための腫瘍マーカーの検出方法に用いるRNAを抽出するための試料の調製方法であって、

生物学的サンプルから細胞成分を分離する工程を含まないことを特徴とする方法である。

ここで、該採取された生物学的サンプルは、凍結されていることが好ましい。

また、本発明は、RNA分解酵素阻害剤が、チオシアン酸グアニジンである、

上記方法である。

また、本発明は、生物学的サンプルが、糞便である、上記の方法である。

また、本発明は、上記の方法の工程に加えて、下記工程：

b) 得られたRNAを抽出するための試料から、RNAを抽出する工程、

5 c) 抽出されたRNAを逆転写し、cDNAを得る工程、

d) 得られたcDNAを増幅する工程、及び

e) 増幅されたcDNAを検出する工程

を含む、大腸癌診断のための腫瘍マーカーの検出方法である。

10 本発明は、腫瘍マーカーが、COX-2である、大腸癌診断のための腫瘍マーカーの検出方法である。

また、本発明は、下記手段：

a) 採取された生物学的サンプルをRNA分解酵素阻害剤の存在下で均質化し、懸濁物を調製する手段、

15 を含む大腸癌診断のための腫瘍マーカーの検出方法に用いるRNAを抽出するための試料の調製のためのキットであって、
生物学的サンプルから細胞成分を分離する手段を含まないことを特徴とするキットである。

また、本発明のキットは、好ましくは、該採取された生物学的サンプルを凍結する手段を含む。

20 また、本発明は、RNA分解酵素阻害剤が、チオシアン酸グアニジンである、上記のキットである。

また、本発明は、生物学的サンプルが、糞便である、上記のキットである。

また、本発明は、さらに、下記手段：

b) 得られたRNAを抽出するための試料から、RNAを抽出する手段、

25 c) 抽出されたRNAを逆転写し、cDNAを得る手段、

d) 得られたcDNAを増幅する手段、及び

e) 増幅されたcDNAを検出する手段

を含む、大腸癌診断のための腫瘍マーカーの検出キットである。

また、本発明は、腫瘍マーカーが、COX-2である、上記のキットである。

図面の簡単な説明

図 1 は、実施例 2 の電気泳動結果である。レーン 1 は、アレキサンダーらの方法でヒト糞便から抽出された全 RNA である。レーン 2 は、本発明の方法でヒト糞便から抽出された全 RNA である。レーン 3 は、ヒト大腸癌組織から抽出された全 RNA である。レーン M は、分子量マーカーである。

発明を実施するための最良の形態

本発明の RNA 分解酵素阻害剤としては、チオシアン酸グアニジン、アイソジェン (Isogene)、ウルトラスペック II (登録商標) (Ultraspec II) 等が挙げられる。

本発明の生物学的サンプルとしては、動植物組織、体液、排泄物等を挙げることができ、好ましくは、糞便、より好ましくは、ヒトの糞便である。

本発明の生物学的サンプルは、そのままか、又は場合により凍結して用いることができる。

凍結方法は、任意の従来技術を用いることができ、好ましくは、液体窒素を用いる方法である。凍結温度は、保存温度は、 $-1 \sim -196^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは、 $-20 \sim -196^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは、 $-75 \sim -196^{\circ}\text{C}$ 、より好ましくは、 $-110 \sim -196^{\circ}\text{C}$ 、最も好ましくは -196°C である。

凍結されたサンプルは、冷凍保存してもよい。保存温度は、 $-75 \sim -196^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは、 $-110 \sim -196^{\circ}\text{C}$ 、より好ましくは -196°C である。保存期間は、1 日～10 年、好ましくは、1 日～3 年、より好ましくは、1 日～1 年である。

本発明で用いられる腫瘍マーカーとしては、COX-2、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)、c-met、CD44 変異体 (variants)、EGF-R、EF-1、Wnt-2、ブラディオニン (Bradykinin)、SKP2、KPC-1、KPC-2、PRL-3、アンギオゲニン (Angiogenin)、インテグリン (Integrin)、Snail、Dysadherin 等が挙げられるが、好ましくは、COX-2 である。

上記工程 c) ～ e) は、RT-PCR 法と呼ばれるものであり、例えば、関谷

剛男等編、PCR法最前線、1997年、共立出版、第187頁～第196頁の記載にしたがって行うことができる。

懸濁物からのRNAの抽出は、従来公知の方法を用いることができ、例えば、RNeasy Mini (QIAGEN) やRNA Extraction Kit (Pharmacia Biotech) のような市販のキットを用いることができる。

本発明で逆転写とは、逆転写酵素 (Reverse Transcriptase) を用いてRNAを相補的なDNA (cDNA) に転換することをいう。逆転写反応は、通常、バッファー、 $MgCl_2$ や KCl 等の塩類、ジチオスレイトール (DTT)、プライマー、デオキシリボヌクレオチド類、RNase 阻害剤及び逆転写酵素を含む溶液を用いて行われる。上記塩類は、適宜、他の塩類に変更して試用することができる。また、ゼラチン、アルブミン等のタンパク質や界面活性剤等を添加することもできる。

逆転写に続いて行われるcDNAの増幅は、通常、PCRが用いられる。PCRの反応液は、通常、バッファー、 $MgCl_2$ や KCl 等の塩類、プライマー、デオキシリボヌクレオチド類、及び耐熱性ポリメラーゼを含む。上記塩類は、適宜、他の塩類に変更して試用することができる。また、ゼラチン、アルブミン等のタンパク質、ジメチルスルホキシドや界面活性剤等を添加することもできる。

cDNAの増幅は、LAMP法 (特許第3313358号公報) やICAN法 (特開2001-136965) を用いることもできる。

本発明でプライマーとは、cDNA合成や核酸増幅の際の合成開始点として働くオリゴヌクレオチドをいう。プライマーは一本鎖であることが望ましいが、二本鎖も使用することができる。プライマーが二本鎖である場合には、増幅反応に先立ち、一本鎖にすることが望ましい。プライマーは、公知の方法にしたがって合成することができ、また、生物から単離することもできる。

逆転写反応に使用する逆転写酵素は、RNAをcDNAに逆転写することができる酵素を意味する。逆転写酵素としては、RAV (Rous associated virus) やAMV (Avian myeloblastosis virus) 等のレトロウイルス由来の逆転写酵素や、MMLV (Moloney murine leukemia virus) 等のマウスのレトロウイルス由来の逆転写酵素があるが、これらに限定されるものではない。

PCRに用いる耐熱性ポリメラーゼとしては、Taqポリメラーゼが挙げられるが、これに限定されるものではない。

増幅されたDNAの検出方法としては、アガロースゲルを用いる電気泳動を用いることができるが、これに限定されるものではない。

5 また、本発明のキットには、本発明の方法を記載した指示書を含むこともできる。

実施例 1

10 以下の実施例は、本発明を説明するものであるが、本発明を限定するものではない。

 浜松医科大学第1内科に精査・治療目的のために入院し、全大腸内視鏡によって大腸癌の存在が確認された患者30例、及び大腸に腫瘍又は炎症性変化のない（非大腸疾患）患者22例を対象とした。なお、すべての患者からインフォームドコンセントが得られている。

15 糞便は、採便後可及的速やかに5mlチューブに約1gずつ分取し、液体窒素を用いて凍結させ、-80℃で保存した。また、比較対照のため、それぞれの試料について免疫学的便潜血検査法により便中のヒトヘモグロビン（Hb）を測定した。組織は、治療前に受けた内視鏡検査時に癌部と正常部の生検材料を液体窒素で凍結してから-80℃で保存した。その後、ホモジナイザーとグアニジン塩
20 とフェノールを用いてホモジナイズし、クロロホルムとエタノールで全RNAを抽出した。

 得られたRNAの1μgをリバースクリプトII（登録商標）（反応液量20μl、和光純薬）を用いて逆転写しcDNAを得、その一部をGeneTaq（和光純薬）を用いて、ネステッドPCRによって増幅させた。得られたPCRを、
25 4%アガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。

 なお、用いたプライマーは、逆転写では、ランダムプライマーであり、PCRでは、CEAについては、Gerhard（JJCO、1994）に報告されたものであり、COX-2については、独自に設計したものを使用した。PCRは、第1ラウンドを20サイクルで、第2ラウンドを25サイクルで行った。

使用したプライマーを下記に示す。

<CEA>

フォワード 1 : 5'-TCTGGAACCTTCTCCTGGTCTCTCAGCTGG-3'

フォワード 2 : 5'-GGGCCACTGCTGGCATCATGATTG-3'

5 リバース : 5'-TG TAGCTGTTGCAAATGCTTTAAGGAAGAAGC-3'

<COX-2>

フォワード 1 : 5'-CTGAAAACCTCCAAACACAG-3'

フォワード 2 : 5'-GCACTACATACTTACCCACTTCAA-3'

リバース : 5'-ATAGGAGAGGTTAGAGAAGGCT-3'

10 結果

大腸癌 30 例（早期癌 3 例、進行癌 27 例）と対照群 22 例における糞便からの RT-PCR による CEA、COX-2 の検出を試みたところ、以下の結果を得た。

15 CEA は、大腸癌 30 例中の全例で、対照群 22 例中の 21 例で検出された。また、両者から RT-PCR で増幅し得る RNA の抽出が行えることが判明した。

COX-2 は、大腸癌 30 例中の 27 例（盲腸 2 / 2、上行結腸 3 / 5、下行結腸 1 / 1、S 状結腸 7 / 7、直腸 12 / 13、早期癌 2 / 3、進行癌 25 / 27）で検出されたが、対照群 22 例中では、1 例も検出されなかった（感度 90%、特異度 100%）。

20 免疫学的便潜血検査法では、大腸癌 28 例中 23 例及び対照群 22 例中 3 例が陽性であった（感度 82.1%、特異度 86.3%）。

COX-2 陰性大腸癌 3 例中では、1 例で免疫学的便潜血検査が陽性であり、2 例が陰性であった。

免疫学的便潜血検査が陰性の大腸癌 5 例中 3 例で、COX-2 が検出された。

25 実施例 2

ヒト糞便から得られる全 RNA の量及び分子量の分布を、本発明の方法とアレキサンダーの方法（非特許文献 6）とで比較した。対象として、ヒトの大腸癌組織から市販の RNA 抽出剤（アイソジェン、和光純薬）を用いて全 RNA を抽出した。

それぞれの試料から抽出された全RNAの同一量をアガロースゲル上で電気泳動した。

レーン3（ヒト大腸癌組織由来RNA）において認められる2本の主要バンドは、28S及び18SrRNAを示す。また、スメア状の部分は、得られた全RNA中に種々の高分子RNAが含まれていることを示す。

レーン2（本発明の方法による糞便由来RNA）において認められる2本の主要バンドは、腸内細菌由来の23S及び16SrRNAを示す。また、レーン3と同様にスメア状の部分が認められることから、本願発明の方法によって糞便から得られた全RNA中には、種々の高分子RNAが含まれていると考えられる。

これに対して、レーン1では、いかなるバンドもスメアも全く認められず、試料抽出物中には、高分子RNAが含まれていないことを示した。

実際に、レーン2のサンプルからはRT-PCRで目的の産物が得られたが、レーン1のサンプルからは、PCR産物は得られなかった。

本研究結果から、本発明の方法によってヒト糞便から抽出されたRNAは、RT-PCRによる増幅が可能であることが明らかとなった。また、RT-PCRによる糞便からのCOX-2の検出は、90%の感度及び100%の特異度を有することから、従来技術である免疫学的便潜血法に比べて優れていることが証明された。

また、本発明の方法は、報告されているAPC、K-rasやp53遺伝子変異の検出に比べて、検出に必要とする糞便の量が少なくかつ検出感度が高いことから、検出にかかる時間及び労力を大幅に節約することができる。

従来技術の便潜血法が、病変からの「出血」という一般的かつ間接的な事象を対象とするのに対し、本発明の方法は、発癌マーカーであるCOX-2発現という特異的かつ直接的な事象を対象とすることから、本発明の方法によって得られたデータは、より品質の高い診断を提供することができる。

したがって、本発明の方法は、特異度及び感度の高い新規大腸癌の非侵襲的スクリーニング方法として臨床的に極めて有用なものである。

請 求 の 範 囲

1. 下記工程：

a) 採取された生物学的サンプルをRNA分解酵素阻害剤の存在下で均質化し、
懸濁物を調製する工程、

を含む大腸癌診断のための腫瘍マーカーの検出方法に用いるRNAを抽出するための試料の調製方法であって、

生物学的サンプルから細胞成分を分離する工程を含まないことを特徴とする方法。

2. 採取された生物学的サンプルが、凍結されている、請求の範囲第1項記載の方法。

3. RNA分解酵素阻害剤が、チオシアン酸グアニジンである、請求の範囲第1項又は第2項記載の方法。

4. 生物学的サンプルが、糞便である、請求の範囲第1項～第3項いずれか1項記載の方法。

5. 請求の範囲第1項～第4項いずれか1項記載の方法に加えて、下記工程：

b) 得られたRNAを抽出するための試料から、RNAを抽出する工程、

c) 抽出されたRNAを逆転写し、cDNAを得る工程、

d) 得られたcDNAを増幅する工程、及び

e) 増幅されたcDNAを検出する工程

を含む、大腸癌診断のための腫瘍マーカーの検出方法。

6. 腫瘍マーカーが、COX-2である、請求の範囲第1項～第5項いずれか1項記載の方法。

7. 下記手段：

a) 採取された生物学的サンプルをRNA分解酵素阻害剤の存在下で均質化し、
懸濁物を調製する手段、

を含む大腸癌診断のための腫瘍マーカーの検出方法に用いるRNAを抽出するための試料の調製のためのキットであって、

生物学的サンプルから細胞成分を分離する手段を含まないことを特徴とするキット。

8. さらに、採取された生物学的サンプルを凍結する手段を含む、請求の範囲第7項記載のキット。

9. RNA分解酵素阻害剤が、チオシアン酸グアニジンである、請求の範囲第7項又は第8項記載のキット。

5 10. 生物学的サンプルが、糞便である、請求の範囲第7項～第9項いずれか1項記載のキット。

11. さらに、下記手段：

b) 得られたRNAを抽出するための試料から、RNAを抽出する手段、

c) 抽出されたRNAを逆転写し、cDNAを得る手段、

10 d) 得られたcDNAを増幅する手段、及び

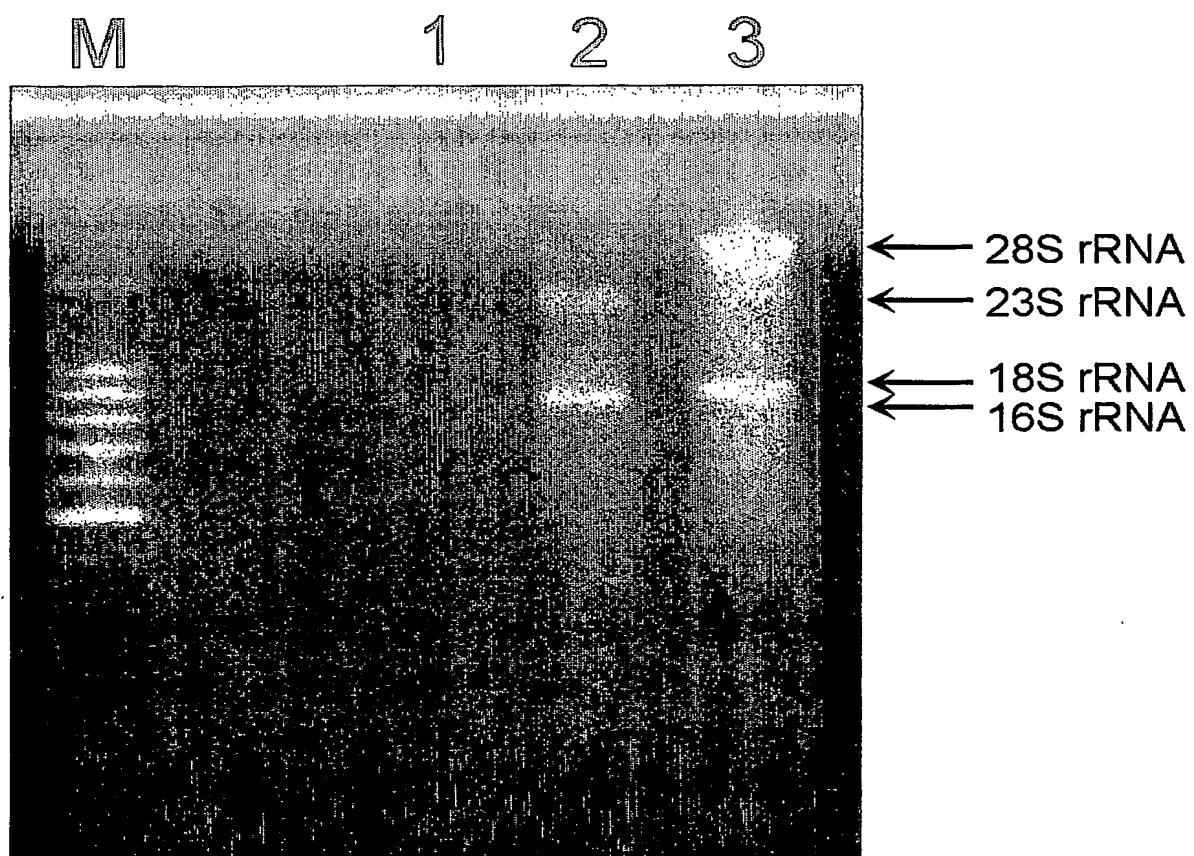
e) 増幅されたcDNAを検出する手段

を含む、大腸癌診断のための腫瘍マーカーの検出キット。

12. 腫瘍マーカーが、COX-2である、請求の範囲第7項～第11項いずれか1項記載のキット。

1 / 1

図 1



1/3

SEQUENCE LISTING

<110> Shizuoka Technology Licensing Organization

<120> Detection method of tumor marker for colon cancer diagnosis.

<130> KP-10665

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> designed primer

<400> 1

tctggaactt ctcttggtct ctcagctgg

29

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

2/3

<220>

<223> designed primer

<400> 2

gggccactgc tggcatcatg attg

24

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> designed primer

<400> 3

tgtagctgtt gcaaatgctt taaggaagaa gc

32

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> designed primer

<400> 4

ctgaaaactc caaacacag

19

3/3

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> designed primer

<400> 5

gcactacata cttacccact tcaa

24

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> designed primer

<400> 6

ataggagagg ttagagaagg ct

22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11972

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N33/50, 33/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ G01N33/50, 33/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Hiroki NAKAGAWA, "Bio Jikken Illustrated 2 Idenshi Kaiseki no Kiso", Shujunsha Co., Ltd., 25 September, 1995 (25.09.95), pages 153 to 166	1-12
Y	CARCINOGENESIS, Vol.19, No.2, (1998), pages 253 to 257	1-12
Y	GASTROENTEROLOGY, Vol.114, No.6, (1998), pages 1196 to 1205	1-12
Y	DIGESTIVE DISEASE AND SCIENCE, Vol.43, No.12, (1998), pages 2652 to 2658	1-12
Y	CANCER RESEARCH, Vol.55, No.17, (1995), pages 3785 to 3789	6,12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
27 November, 2003 (27.11.03)

Date of mailing of the international search report
09 December, 2003 (09.12.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11972

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Japanese Journal of gastroenterology, Vol.99 special extra issue, 20 September, 2002 (20.09. 02), page A634 Sho P-379	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ G01N33/50、33/48		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ G01N33/50、33/48		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2003年 日本国登録実用新案公報 1994-2003年 日本国実用新案登録公報 1996-2003年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	中川広樹著、バイオ実験イラストレイテッド2 遺伝子解析の基礎、秀潤社、1995. 09. 25、p. 153-166	1-12
Y	CARCINOGENESIS, VOL. 19, NO. 2, (1998), p. 253-257	1-12
Y	GASTROENTEROLOGY, VOL. 114, NO. 6, (1998), p. 1196-1205	1-12
Y	DIGESTIVE DISEASE AND SCIENCE, VOL. 43, NO. 12, (1998), p. 2652-2658	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 27. 11. 03	国際調査報告の発送日 09.12.03	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 亀田 宏之 印 2 J 9015 電話番号 03-3581-1101 内線 3251	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	CANCER RESEARCH, VOL. 55, NO. 17, (1995), p. 3785-3789	6, 12
Y	日本消化器病学会雑誌、第99巻臨時増刊号、 2002. 09. 20、p. A634 消P-379	1-12